

# 行政院國家科學委員會補助專題研究計畫成果報告

※※

※ 以酵素基因工程重建幾丁質酵素之產物特異性 (II) ※

※ 基因之過表達與以突變法進行酵素功能之改質 ※

※ 基因之過表達與以突變法進行酵素功能之改質 ※

※※

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC 90-2113-M-009-032-

執行期間：90年 8月 1日至 91年 7月 31日

計畫主持人：李耀坤

本成果報告包括以下應繳交之附件：

- 赴國外出差或研習心得報告一份
- 赴大陸地區出差或研習心得報告一份
- 出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份
- 國際合作研究計畫國外研究報告書一份

執行單位：國立交通大學應用化學系

中華民國 91 年 10 月 28 日

# 行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

計畫編號：NSC 90-2113-M-009-032-

執行期限：90年8月1日至91年7月31日

主持人：李耀坤 執行單位：國立交通大學應用化學系

## 一、中文摘要

由於幾丁質寡醣及其衍生物被發現具有生理活性，如抗菌、增強免疫力、降低膽固醇及抗腫瘤等，特別是含六個醣分子(或以上)之寡醣更具有醫藥潛力。單一長鏈寡醣之製備或合成一直是化學家與生物化學家努力的課題。但由於醣類含數個氫氧官能基和複雜的立體化學等問題，致使其相關研究進行不易。我們將設計一系列計畫建立可行的酵素製備流程以達成此目標。一般醣類水解酵素可分為內切型與外切型，前者產物的分佈較廣，通常可得雙、參、肆醣或更長鏈之寡醣體，但不易大量分離得單一鏈長。而外切型酵素之產物通常為單糖或雙醣。但因其產物的特異性較內切型高，故適合以蛋白質基因工程之技術調整其與基質結合之活性區的深淺和大小以改變其產物特異性。我們已成功由黏質沙雷氏桿菌(*Serratia marcescens*) 選殖出外切型的幾丁質水解酵素，用來生產幾丁質雙醣，並計畫建立可行的酵素製備流程以達成生產 chitobiose 及其他寡醣之技術。接著，我們也利用其已知之 3D 結構進行分子模擬與基因改造，期望以蛋白質基因工程之技術改變其產物特異性。其中如 T441C、V521C、S551C、T441C/V521C、V521C/S551C、Glu315、Tyr390 等突變點均於本計畫中被進一步研究。

**關鍵詞：**黏質沙雷氏桿菌、酵素表達、幾丁質、幾丁質雙醣

## Abstract

A chitinase gene of *Serratia marcescens* (ChiA) was cloned by PCR. The ChiA was further constructed into pRSETA vector and transformed into *E. coli* JM109 cells for protein expression. DNA sequence analysis and comparison revealed that the region requires for protein expression involving an open reading frame of 1689 base pairs, correspondent to 563 amino acids with a N-terminal signal peptide of 23 residues. An intracellular chitinase was further purified to >90% homogeneity by the hydrophobic interaction chromatography following by ion-exchange separation. Chitobiose is the predominant product through out the enzymatic hydrolysis of the colloidal chitin, indicating that the purified chitinase is an exo-chitinase. With the application of the wild-type chitinase, a 10-gramed scale reaction was performed for chitobiose preparation. The catalytic properties and stability of several mutants such as Glu315, Tyr390, T441C, V521C, S551C, T441C/V521C, V521C/S551C were also studied.

**Keywords:** *Serratia marcescens*, expression, Chitinase, Chitobiose

## 緣由與目的

植物病蟲害的防治為確保糧食生產的有效方法，然而目前所使用之殺菌劑對環境具有相當的危害。所以應用幾丁質酵素作為生物控制劑 (biologic control reagent) 抵抗病蟲害是可行的替代方法。植物在受到真菌、細菌、病毒等病原體攻擊時，細胞會合成各種蛋白質來阻止感染。幾丁質酵素為能水解幾丁質之  $\alpha$ -1,4 鍵的酵素，存在於麥類、豆類等植物中。幾丁質酵素與  $\alpha$ -1,3 聚葡萄糖酵素同樣地會伴隨著病原體的感染而被誘導合成，能分解侵入植物組織內之病原菌的細胞壁，阻止其生長。病原菌細胞壁水解生成之低分子化的幾丁寡醣，促進植物生成植物防禦素及合成蛋白水解酵素抑制劑等，進一步誘發植物的一系列生體防衛反

應，達到生物控制的目的。

以往在製備 N-乙醯幾丁寡糖時多採用化學法將幾丁質降解，但由於使用相當大量的酸、鹼，不但實驗過程具危險性，而且使用完畢的大量酸、鹼更對環境造成危害，因此我們從酵素方面來研究 N-乙醯幾丁寡糖的製備。包括 *Serratia marcescens* 幾丁質酵素 (*Chi A*) 基因的選殖、酵素純化及性質的分析；基因改造 *Serratia marcescens* 幾丁質酵素 (*Chi A*)，希望藉基因改造如 T441C、V521C、S551C、T441C/V521C、V521C/S551C 等突變點，來增加酵素的熱穩定性以及改變水解的最終產物；再對重要基團如 Glu315、Tyr390 等進行突變，以研究酵素水解反應機制。*S. marcescens* 的幾丁質酵素 (*Chi A*)，水解幾丁質的主要產物為幾丁二糖，但眾說紛紜，有的認為其為內切型酵素、有的認為其為外切型酵素，主要是因為缺乏可快速分析水解產物的儀器。由於幾丁質酵素 (*Chi A*) 其水解產物主要為幾丁二糖，所以可用來生產大量的幾丁二糖。

### **實驗方法:**

#### 膠狀幾丁質 (colloidal chitin) 的製備

50 克幾丁質粉末先以酒精 (工業級) 潤濕，再以 500 毫升濃鹽酸在室溫下進行酸水解反應二小時之後，離心去除未反應完的雜質及幾丁質。加水稀釋酸濃度至產生沈澱後，離心取沈澱物，然後用水清洗沈澱物數次，再以氫氧化鈉中和之。繼續以水洗滌產物數次，以除去其中所含的鹽類。最後以 pH 7.0，20 mM 的 phosphate buffer 調整為 1% 懸浮液即可。

#### 酵素活性之測定

取 250  $\mu$ L 之酵素液，添加 250  $\mu$ L，1% 膠態幾丁質，在 37 $^{\circ}$ C 下振盪反應 60 分鐘後，立即加入 500  $\mu$ L 試劑 DNS，於 90 $^{\circ}$ C 下反應 10 分鐘。離心後，取上清液測定還原糖生成量 (OD 540)。以未反應的酵素反應液作相同的測定來作為空白樣品。一個酵素活性單位定義為每分鐘可水解膠態幾丁質產生 1  $\mu$ mole 還原糖當量的酵素量。

#### 幾丁質酵素之選殖

首先，*S. marcescens* 的染色體 DNA 先行以傳統法抽出，再根據 NCBI 基因資料庫上 *S. marcescens* 的基因序列，設計引子 (primers) 如下：

CTN5P:5 -GGAATCA CATAT GCGCAAATTTAA-3'，

CTN3P:5 -GCAACCGATTATTGAACGCCGG-3'

在設計引子時也設計了一個 Nde cutting site 在引子 CTN5P 中 (CATAT 為突變位置)。接著以 *S. marcescens* 的染色體 DNA 為模板，進行幾丁質酵素基因 *chi A* gene 的 PCR 放大反應。在實驗過程當中，使用 *vent* DNA 聚合酵素，黏合 (annealing) 溫度為 60 $^{\circ}$ C，PCR 反應後，成功的將 *chi A* gene 放大，大小約為 1692 bp。*chi A* 基因片段以 ABI 310 定序儀進行定序。

#### 幾丁質酵素 (chitinase) 的純化

- 1、離下菌液，在 4 $^{\circ}$ C 以 7000 rpm 離心 15 分鐘，棄去上層液，取離心下的菌體，以 phosphate buffer 10 mL (20 mM, pH 7.0) 溶解菌體，搖晃使成均勻懸浮。
- 2、加入 10 mM PMSF 10  $\mu$ L / 1 mL 菌液，以超音波震盪使菌體破裂 (45 W, 75% pulse)，在 4 $^{\circ}$ C 以 15000 rpm 離心 15 分鐘，將上層液與細胞殘骸分開，此上層液即胞內

粗提取液。

- 3、於冰浴下，在粗提液中加入硫酸銨鹽至 70 % 飽和度，靜置 1 小時後，在 4 °C 以 15000 rpm 離心 20 分鐘，取沈澱於 4 °C 保存。
- 4、取硫酸銨鹽飽和度為 0 到 70 % 區間的酵素沈澱，加入 phosphate buffer (20 mM, pH 7.0) 5 mL 溶解。
- 5、導入預先以 phosphate buffer (20 mM + 1 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 7.0) 平衡的 HIC column，進行層析分離。
- 6、取 4 mL 經濃縮之 HIC 粗分液，導入預先以 phosphate buffer (20 mM, pH 8.0) 平衡之 HiTrap SP 陽離子(4 個)和 HiTrap Q 陰離子(4 個)交換樹脂串聯管柱，進行層析分離。

### 突變株之突變與選殖

設計之突變點：T441C、V521C、S551C、T441C / V521C、V521C / S551C。其 primer 之設計如下：

T441C：

5'P.....GCAAGATCGTGGTCGGC(ACC)TGCGCCATGTATGGC...3'OH,  
3'OH...CGTTCTAGCACCAGCCG(TGG)ACGCGGTACATACCG...5'P

V521C：

5'P.....CGACGATGCCCCGCTCG(GTG)TGTCAGGCCAAAGGCAAG..3'OH  
3'OH...GCTGCATCGGGCGAGC(CAC)ACAGTCCGGTTTCCGTTC...5'P

S551C：

5'P.....GCGATATTCTCAAC(TGC)TGCATGAACGCCAGCC...3'OH  
3'OH...CGCTATAAGAGTTGACG)ACGTACTTGCGGTCGG...5'P

所有突變株均以 (Quick-change) 進行定點突變

### 結果與討論

#### PCR 基因選殖與基因表達系統之建構

首先，*S. marcescens* 的染色體 DNA 先行以傳統法抽出，再根據 NCBI 基因資料庫上 *S. marcescens* 的基因序列，設計引子(primers)如下：

CTN5P：5'-GGAATCACATATGCGCAAATTTAA-3

CTN3P：5'-GCAACCGATTATTGAACGCCGG-3

在設計引子時也設計了一個 Nde cutting site 在引子 CTN5P 中 (CATAT 為突變位置)。接著以 *S. marcescens* 的染色體 DNA 為模板，進行幾丁質酵素基因 *chi A* gene 的 PCR 放大反應。在實驗過程當中，使用 *vent* DNA 聚合酵素，黏合(annealing)溫度為 60 °C，PCR 反應後，成功的將 *chi A* gene 放大。

將 *S. marcescens* 的 *chi A* gene(名為 *ChiA\_NCTU*)成功建構於 pRSET A 之後，利用 DNA 定序儀對整段 *chi A* gene 做完整之定序如圖一，其結果顯示此段 gene 的 ORF (open reading frame) 共有 1692 個 核 酸 碼，編 3 個胺基酸。經與 NCBI 基因資料庫上 *S. marcescens* 菌的另五段 chitinase A (accession number：1CTN、1EDQ\_A、BAA31567、AF454462-1 和

S60651) 基比對，其差異性均在 7 個胺基酸以內。圖一中以粗體標示之胺基酸為 *ChiA\_NCTU* 與所有五株 *ChiA* (563 a.a) 比較後之差異處，顯然這些位置的變異並未影響酵素的活性。同時若將所選殖的 *ChiA\_NCTU* 與基因資料庫上具有 3D 結構的 chitinase A (accession number: 1CTN) 詳細比較，可發現兩者之間除了有 3 個胺基酸不同之外，其胺基酸數、DNA 長度與 Cys 的數目均相同，所以預測兩者的 3D 結構應相同。

1	<b>Met</b>	Arg	Lys	Phe	Asn	Lys	Pro	Leu	Leu	Ala	Leu	Leu	Ile	Gly	Ser
1	ATG	CGC	AAA	TTT	AAT	AAA	CCG	CTG	TTG	GCG	CTG	TTG	ATC	GGC	AGC
16	Thr	Leu	Cys	Ser	Ala	Ala	Gln	Ala	Ala	Ala	Pro	Gly	Lys	Pro	Thr
46	ACG	CTG	TGT	TCC	GCG	GCG	CAG	GCC	GCC	GCG	CCG	GGC	AAG	CCG	ACC
31	Ile	Ala	Trp	Gly	Asn	Thr	Lys	Phe	Ala	Ile	Val	Glu	Val	Asp	Gln
91	ATC	GCC	TGG	GGC	AAC	ACC	AAG	TTC	GCC	ATC	GTT	GAA	GTT	GAC	CAG
46	Ala	Ala	Thr	Ala	Tyr	Asn	<b>Asn</b>	Leu	Val	Lys	Val	Lys	Asn	Ala	Ala
136	GCG	GCT	ACC	GCT	TAT	AAT	AAT	TTG	GTG	AAG	GTA	AAA	AAT	GCC	GCC
61	Asp	Val	Ser	Val	Ser	Trp	Asn	Leu	Trp	Asn	Gly	Asp	<b>Ala</b>	Gly	Thr
181	GAT	GTT	TCC	GTC	TCC	TGG	AAT	TTA	TGG	AAT	GGC	GAC	GCG	GGC	ACG
76	Thr	Ala	Lys	<b>Ile</b>	Leu	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Ala	Trp	Ser	Gly	Pro
226	ACG	GCC	AAG	ATT	TTA	TTA	AAT	GGT	AAA	GAG	GCG	TGG	AGT	GGT	CCT
91	Ser	Thr	Gly	Ser	Ser	Gly	Thr	Ala	Asn	Phe	Lys	Val	Asn	Lys	Gly
271	TCA	ACC	GGA	TCT	TCC	GGT	ACG	GCG	AAT	TTT	AAA	GTG	AAT	AAA	GGC
106	Gly	Arg	Tyr	Gln	Met	Gln	Val	Ala	Leu	Cys	Asn	Ala	Asp	Gly	Cys
316	GGC	CGT	TAT	CAA	ATG	CAG	GTG	GCA	TTG	TGC	AAT	GCC	GAC	GGC	TGC
121	<b>Thr</b>	Ala	Ser	Asp	Ala	Thr	Glu	Ile	Val	Val	Ala	Asp	Thr	Asp	Gly
361	ACC	GCC	AGT	GAC	GCC	ACC	GAA	ATT	GTG	GTG	GCC	GAC	ACC	GAC	GGC
136	Ser	His	Leu	<b>Pro</b>	Pro	Leu	Lys	Glu	Pro	Leu	Leu	Glu	Lys	Asn	Lys
406	AGC	CAT	TTG	CCG	CCG	TTG	AAA	GAG	CCG	CTG	CTG	GAA	AAG	AAT	AAA
151	Pro	Tyr	Lys	Gln	Asn	Ser	Gly	Lys	Val	Val	Gly	Ser	Tyr	Phe	Val
451	CCG	TAT	AAA	CAG	AAC	TCC	GGC	AAA	GTG	GTC	GGT	TCT	TAT	TTC	GTC
166	Glu	Trp	Gly	Val	Tyr	Gly	Arg	Asn	Phe	Thr	Val	Asp	Lys	Ile	Pro
496	GAG	TGG	GGC	GTT	TAC	GGG	CGC	AAT	TTC	ACC	GTC	GAC	AAG	ATC	CCG
181	Ala	Gln	Asn	Leu	Thr	His	Leu	Leu	Tyr	Gly	Phe	Ile	Pro	Ile	Cys
541	GCG	CAA	AAC	CTG	ACC	CAC	CTG	CTG	TAC	GGC	TTT	ATC	CCG	ATC	TGC
196	Gly	Gly	Asn	Gly	Ile	Asn	Asp	Ser	Leu	Lys	Glu	Ile	Glu	Gly	Ser
586	GGC	GGC	AAT	GGC	ATC	AAC	GAC	AGC	CTG	AAA	GAG	ATT	GAA	GGC	AGC
211	Phe	Gln	Ala	Leu	Gln	Arg	Ser	Cys	Gln	Gly	Arg	Glu	Asp	Phe	Lys
631	TTC	CAG	GCG	TTG	CAG	CGC	TCC	TGC	CAA	GGC	CGC	GAG	GAC	TTC	AAA

226 **Ile** Ser Ile His Asp Pro Phe Ala Ala Leu Gln Lys Ala Gln Lys  
 676 ATC TCG ATC CAC GAT CCG TTC GCC GCG CTG CAA AAG GCG CAG AAG  
  
 241 Gly Val Thr Ala Trp Asp Asp Pro Tyr Lys Gly Asn Phe Gly Gln  
 721 GGC GTG ACC GCC TGG GAT GAC CCC TAC AAG GGC AAC TTC GGC CAG  
  
 256 Leu Met Ala Leu Lys Gln Ala His Pro Asp Leu Lys Ile Leu Pro  
 766 CTG ATG GCG CTG AAG CAG GCG CAT CCT GAC CTG AAA ATC CTG CCG  
  
 271 Ser Ile Gly Gly Trp Thr Leu Ser Asp Pro Phe Phe Phe Met Gly  
 811 TCG ATC GGC GGC TGG ACG CTG TCC GAC CCG TTC TTC TTC ATG GGC  
  
 286 Asp Lys Val Lys Arg Asp Arg Phe Val Gly Ser Val Lys Glu Phe  
 856 GAC AAG GTG AAG CGC GAT CGC TTC GTC GGT TCG GTG AAA GAG TTC  
  
 301 Leu Gln Thr Trp Lys Phe Phe Asp Gly Val Asp Ile Asp Trp Glu  
 901 CTG CAG ACC TGG AAG TTC TTC GAC GGC GTG GAT ATC GAC TGG GAG  
  
 316 Phe Pro Gly Gly Lys Gly Ala Asn Pro Asn Leu Gly Ser Pro Gln  
 946 TTC CCG GGC GGC AAA GGC GCC AAC CCT AAC CTG GGC AGC CCG CAA  
  
 331 Asp Gly Glu Thr Tyr Val Leu Leu Met Lys Glu Leu Arg Ala Met  
 991 GAC GGG GAA ACC TAT GTG CTG CTG ATG AAG GAG CTG CGG GCG ATG  
  
 346 Leu Asp Gln Leu Ser **Ala** Glu Thr Gly Arg Lys Tyr Glu Leu Thr  
 1036 CTG GAT CAG CTG TCG GCG GAA ACC GGC CGC AAG TAT GAG CTG ACC  
  
 361 Ser Ala Ile Ser Ala Gly Lys Asp Lys Ile Asp Lys Val Ala Tyr  
 1081 TCC GCC ATC AGC GCC GGT AAG GAC AAG ATC GAC AAG GTG GCT TAC  
  
 376 Asn Val Ala Gln Asn Ser Met Asp His Ile Phe Leu Met Ser Tyr  
 1126 AAC GTT GCG CAG AAC TCG ATG GAT CAC ATC TTC CTG ATG AGC TAC  
  
 391 Asp Phe Tyr Gly Ala Phe Asp Leu Lys Asn Leu Gly His Gln Thr  
 1171 GAC TTC TAT GGC GCC TTC GAT CTG AAG AAC CTG GGG CAT CAG ACC  
  
 406 Ala Leu Asn Ala Pro Ala Trp Lys Pro Asp Thr Ala Tyr Thr Thr  
 1216 GCG CTG AAT GCG CCG GCC TGG AAG CCG GAC ACC GCT TAC ACC ACG  
  
 421 Val Asn Gly Val Asn Ala Leu Leu Ala Gln Gly Val Lys Pro Gly  
 1261 GTG AAC GGC GTG AAT GCG CTG CTG GCG CAG GGC GTC AAG CCG GGC  
  
 436 Lys Ile Val Val Gly Thr Ala Met Tyr Gly Arg Gly Trp Thr Gly  
 1306 AAA ATC GTC GTC GGC ACC GCC ATG TAT GGC CGC GGC TGG ACC GGG  
  
 451 Val Asn Gly Tyr Gln Asn Asn Ile Pro Phe Thr Gly Thr Ala Thr  
 1351 GTG AAC GGC TAC CAG AAC AAC ATT CCG TTC ACC GGC ACC GCC ACC  
  
 466 Gly Pro Val Lys Gly Thr Trp Glu Asn **Gly** Ile Val Asp Tyr Arg  
 1396 GGG CCG GTT AAA GGC ACC TGG GAG AAC GGC ATC GTG GAC TAC CGC  
 481 Gln Ile Ala **Ser** Gln Phe Met Ser Gly Glu Trp Gln Tyr Thr Tyr  
 1441 CAA ATC GCC AGC CAG TTC ATG AGC GGC GAG TGG CAG TAT ACC TAC  
  
 496 Asp Ala Thr Ala Glu Ala Pro Tyr Val Phe Lys Pro Ser Thr Gly

```

1486   GAC GCC ACG GCG GAG GCG CCT TAC GTG TTC AAA CCT TCC ACC GGC
511    Asp Leu Ile Thr Phe Asp Asp Ala Arg Ser Val Gln Ala Lys Gly
1531   GAT CTG ATC ACC TTC GAC GAT GCC CGC TCG GTG CAG GCT AAA GGC

526    Lys Tyr Val Leu Asp Lys Gln Leu Gly Gly Leu Phe Ser Trp Glu
1576   AAG TAC GTG CTG GAT AAA CAG CTG GGC GGC CTG TTC TCC TGG GAG

541    Ile Asp Ala Asp Asn Gly Asp Ile Leu Asn Ser Met Asn Ala Ser
1621   ATC GAC GCG GAC AAC GGC GAT ATT CTC AAC AGC ATG AAC GCC AGC

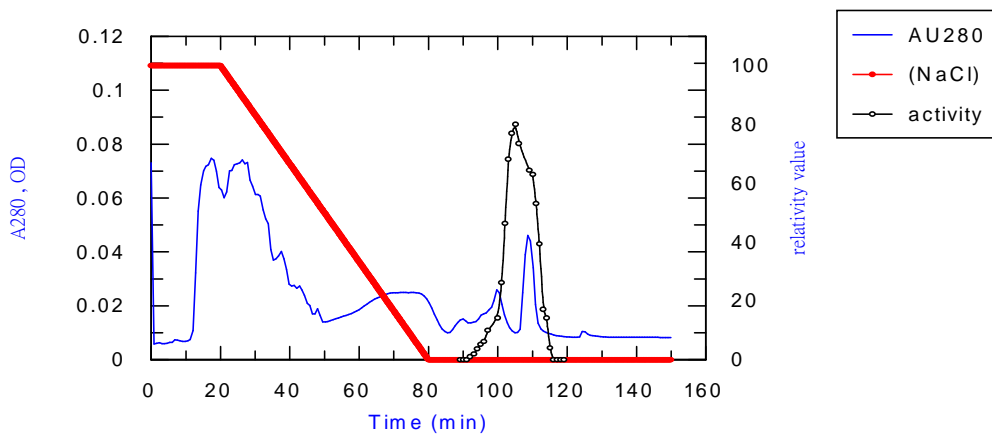
556    Leu Gly Asn Ser Ala Gly Val Gln ***
1666   CTG GGC AAC AGC GCC GGC GTT CAA TAA

```

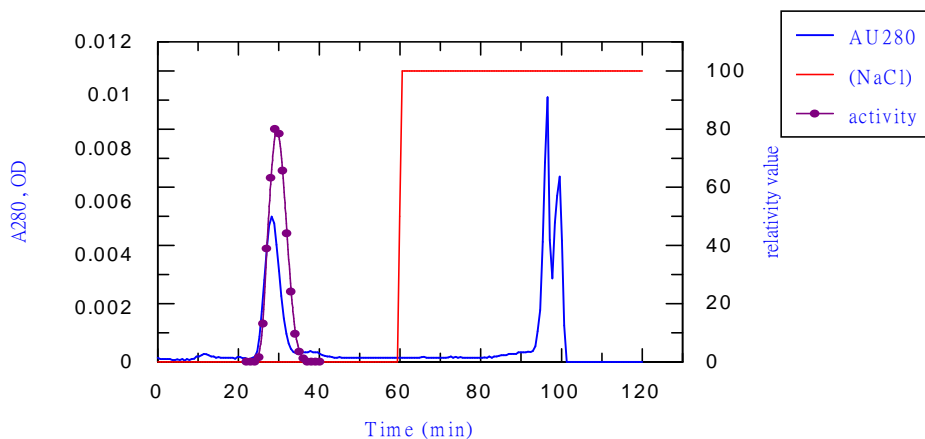
圖一: *ChiA\_NCTU* 之基因與胺基酸序列。

### 重組幾丁質酵素的純化

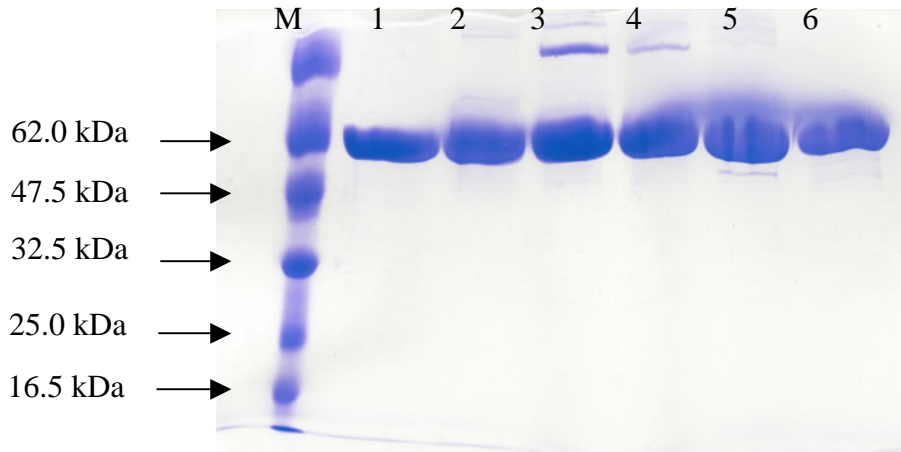
重組酵素及其突變酵素均可以 HIC 管柱 (如圖二) 和串聯式 SP 和 Q 管柱(如圖三)進行純化，所得酵素可達 90% 以上之均一度(homogeneity)，圖四為其 SDS-PAGE 分析結果。進一步以質譜儀偵測 wide type *ChiA\_NCTU* 的分子量，測得分子量為 58605 Da，此數據證明 *ChiA\_NCTU* 不含訊息胜，為成熟蛋白質 (mature protein)



圖二: Hydrophobic interaction column (HIC) 層析結果。偵測波長:280 nm、含鹽沖提液:phosphate buffer (20 mM + 1 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , pH 7.0)、無鹽沖提液: pure water、流速: 1.0 mL/min



圖三、SP 和 Q HiTrap column 串聯層析結果。偵測波長：280 nm、沖提液：phosphate buffer (20 mM, pH 8.0)、鹽類沖提液：phosphate buffer (20 mM + 1 M NaCl, pH 8.0)、流速：1 mL/min。



圖四、突變株純化結果之 SDS-PAGE 圖。M： protein marker、Lane 1： wide type、Lane 2： T441C、Lane 3： V521C、Lane 4： S551C、Lane 5： T441C/V521C、Lane 6： V521C/S551C

#### 突變酵素的研究

本實驗設計之目的是希望藉由基因改造在酵素中形成雙硫鍵，以期增加酵素的熱穩定性，並研究酵素水解的最終產物。首先從已知 3D 結構中找尋適當之位置，估計若使 441 和 521 或 521 和 551 間形成雙硫鍵，或可達到穩定的目的。所以設計 T441C/V521C 和 V521C/S551C 兩個雙點突變 (double-mutation)。同時也希望在雙硫鍵形成時，對活性區域造成影響，使水解產物發生改變，以獲得不同的產物。我們也針對此二胺基酸位置設計三種突變酵素 E315A、Y390F 及 E315A/Y390F，試圖釐清上述反應機制的不同。

溫度是酵素催化速率之重要因素，但溫度過高亦將破壞酵素之結構而造成失活之現象，因此瞭解酵素與溫度間之關係有助於尋找酵素應用的最佳條件。由 *ChiA*\_NCTU 在 37 °C ~ 60 °C 之間的活性穩定度比較結果發現，當溫度  $\leq 50$  °C 時，在 4 小時內，wide type、T441C、V521C、S551C、T441C/V521C、V521C/S551C 等之活性並沒有明顯的變化，顯示酵素在這些溫度下具有良好的穩定度。但當溫度  $> 50$  °C 時，酵素活性則迅速下降。突變株 T441C/V521C 和 V521C/S551C 兩者的設計目的，主要是為了在酵素中引進額外的雙硫鍵，以增加酵素的熱穩定性，但結果顯示，兩突變株酵素的耐熱溫度並沒有明顯增高。可能的原因是此新增加雙硫鍵對 *ChiA*\_NCTU 結構未發揮作用，另一可能該雙硫鍵並未順利形成，此點仍需進一步的確認。

經由突變後酵素活性的測試，發現三株突變酵素均完全失去 chitinase 的活性，可見 Glu315、Tyr390 均在催化活性上扮演重要角色。此結果與 Dr. Papanikolau 等人所推測之重要殘基功能完全吻合。



## 幾丁質酵素水解產物之探討

據文獻報導 *S. marcescens* chitinase A 的水解產物為 N-乙醯幾丁二糖，所以文獻中部份認為 chitinase A 為 exo-chitinase，但也有部份文獻因為得到 2、3、4 糖的產物，所以認為 chitinase A 為 endo-chitinase，而當我們將 wide type *chiA* 與 1% 膠狀幾丁質在 37°C 反應 24 小時，以質譜儀偵測水解產物，測得其產物為 N-乙醯幾丁二糖及少量的 N-乙醯幾丁單糖。

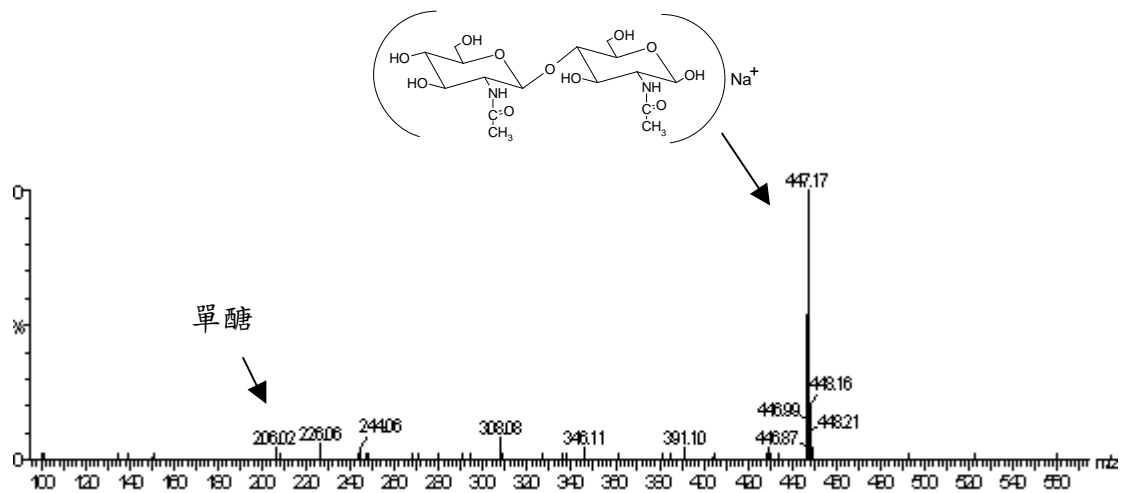
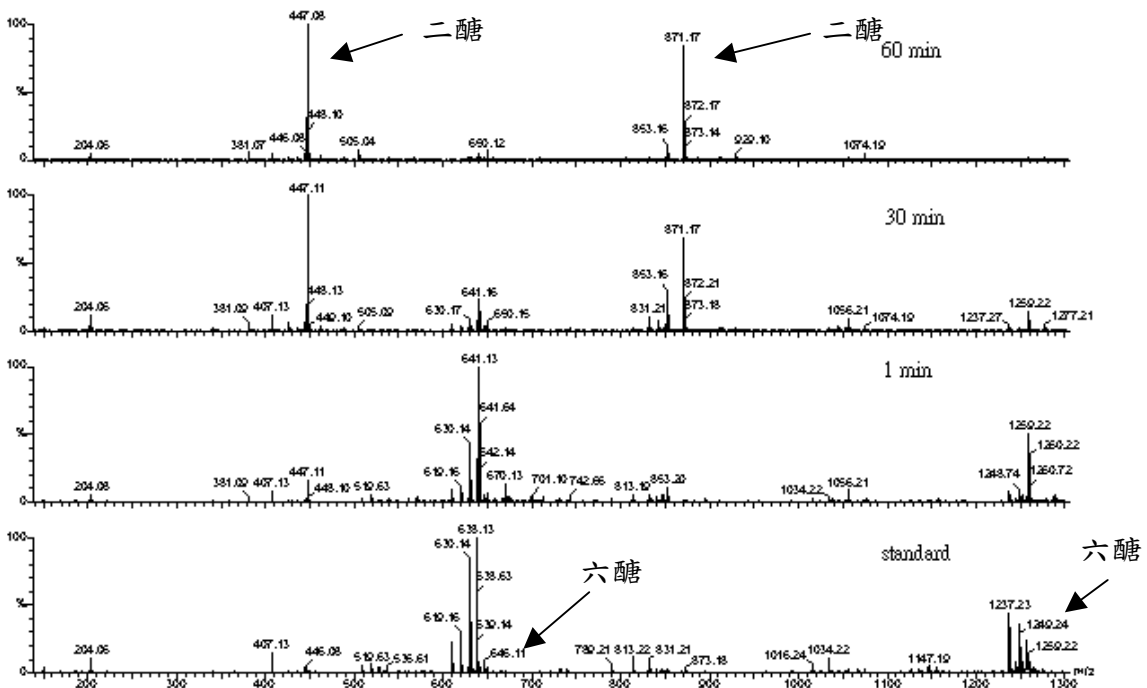


圖 五、wide type *ChiA*\_NCTU 水解膠狀幾丁質的產物分析

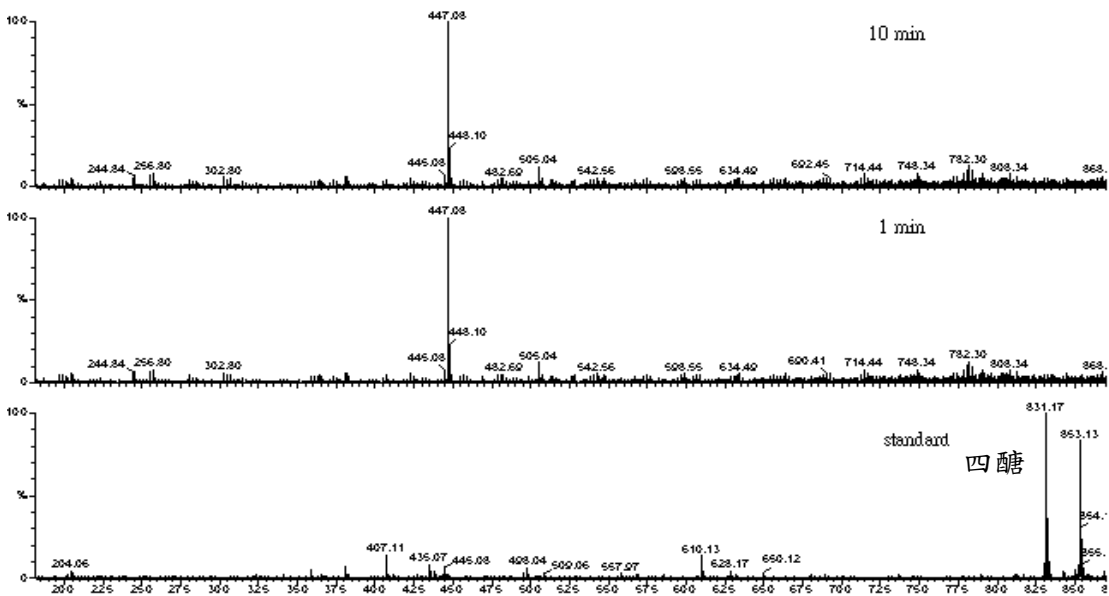
為更精確得知此酵素屬於何種酵素，故將此酵素 (20  $\mu\text{L}$ , 0.84  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 分別和 N-乙醯幾丁二糖、三糖、四糖、五糖、六糖 (80  $\mu\text{L}$ , 2.5 mM) 在 37 °C 下進行水解反應，結果如表一所統計：

表一：ChitA\_NCTU 對寡糖之催化產物

反應物	產物
N-乙醯幾丁二糖	N-乙醯幾丁二糖
N-乙醯幾丁三糖	N-乙醯幾丁單糖、N-乙醯幾丁二糖、N-乙醯幾丁三糖
N-乙醯幾丁四糖	N-乙醯幾丁二糖
N-乙醯幾丁五糖	N-乙醯幾丁單糖、N-乙醯幾丁二糖、N-乙醯幾丁三糖
N-乙醯幾丁六糖	N-乙醯幾丁二糖



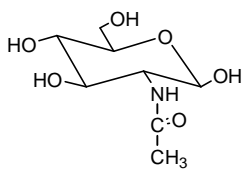
圖六、六糖與酵素 wide type *ChiA\_NCTU* 反應，在不同時間所測得的結果



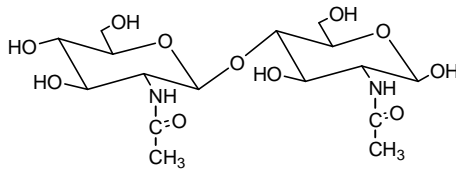
圖七、四糖與酵素 wide type *ChiA\_NCTU* 反應，在不同時間所測得的結果

圖六與圖七分別為 wide type 水解幾丁六糖和四糖之質譜分析圖，圖六中，當反應時間為 1 min 時，質譜峰出現  $m/z$  為 641 與 1259 兩群峰，其中 1259 峰為幾丁六糖含一  $\text{Na}^+$  之  $m/z$  值，而 641 則為幾丁六糖含兩個  $\text{Na}^+$ ，故其  $m/z$  為  $1282/2=641$ 。分子量計算簡述如下：

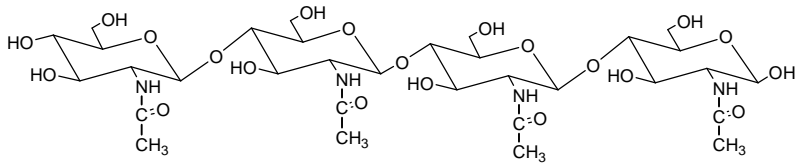
單糖：



二糖：

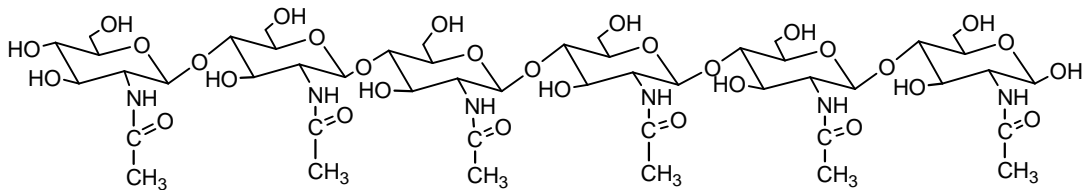


四醣：



$$(M.W\ 221 \times 4 - 18 \times 3 = 830)$$

六醣：



$$(M.W\ 221 \times 6 - 18 \times 5 = 1236)$$

反應至 30 分鐘後 641 與 1259 峰已明顯下降，而新增了 447 峰與 871 峰，447 峰為雙醣含一  $\text{Na}^+$  離子，而 871 (447+424) 則為一含  $\text{Na}^+$  之雙醣吸附一未帶電荷之雙醣，在質譜中並未出現三醣之譜峰。圖六之質譜分析如上述。

由上述結果得知，所選殖野生株 *ChiA\_NCTU* 與四醣反應時，其產物為二醣並沒有單醣產生；同樣的，在與六醣反應時，產物亦為二醣並沒有單醣和三醣產生，因此推測野生株 *ChiA\_NCTU* 為 *exo-chitinase*。幾丁三醣雖可水解為一醣和二醣，但被催化之速率明顯低於四醣，五醣可快速被水解成二醣、三醣和少量之一醣，可見四醣以上方能有效被酵素水解，此應與酵素受質之結合性有密切關係。而與膠狀幾丁質反應所產生單醣的原因，可能是因為膠狀幾丁質鏈單體為單數所造成。

已知各酵素在各個溫度的熱穩定性以及在各種 pH 值下的穩定度，所以已可以確定酵素水解反應的條件範圍，以便水解反應的進行。將各酵素與不同 buffer：MES (100 mM, pH 4.0)，NaOAc (100 mM, Sodium acetate, pH 5.0)，phosphate (100 mM, pH 6.0, pH 7.0)，Tris (100 mM, pH 8.0)， $\text{NaHCO}_3$  (100 mM, pH 9.0) 之 1% 膠狀幾丁質，在 37 °C 下反應 48 小時。由結果顯示，其水解產物仍為幾丁質二醣，各酵素並沒有因突變而改變水解產物。另在 pH 4.0 時，由於緩衝液過酸，導致反應過慢以致酵素容易失活，以質譜儀偵測水解產物時，幾丁二醣的訊號非常的微弱，且酵素和膠狀幾丁質反應並不完全。而在以磷酸鹽為緩衝液，pH 6.0、7.0 進行水解反應時，膠狀幾丁質可被酵素有效水解，但卻不易以質譜儀偵測水解產物，此產物偵測問題可改以  $\text{NH}_4\text{OAc}$  為緩衝溶液而得到改善。

在以  $\text{NH}_4\text{OAc}$  為緩衝液時，測得反應在 pH 6.0 時水解產物為幾丁單醣，而其他 pH 值下產物均為幾丁二醣，而幾丁單醣的形成的原因亦是酵素催化結果。在以  $\text{NH}_4\text{OAc}$  為緩衝液時最佳之反應 pH 值為 5.0。

同樣地，在以 Tris  $\cdot$  HCl 為緩衝液時，結果亦發現反應在 pH 9.0 時水解產物為幾丁單醣，主要原因亦是酵素本身水解所造成。以 Tris  $\cdot$  HCl 為緩衝液時最佳之反應 pH 值為 7.0。

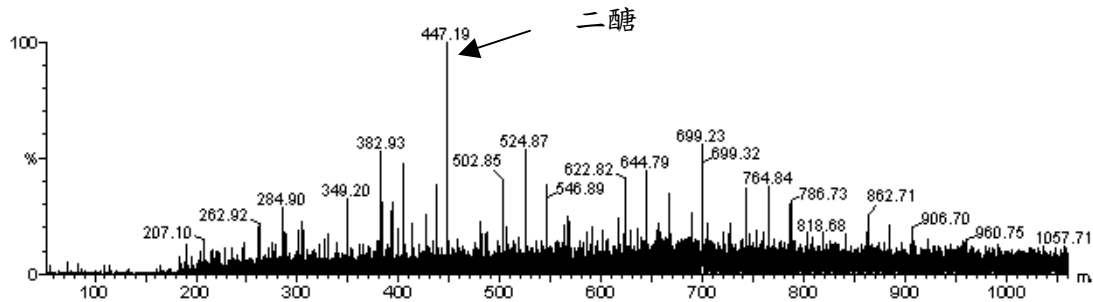
由以上之結果：證實各突變株酵素 T441C、V521C、S551C、T441C/V521C、V521C/S551C 的水解產物並沒有發生改變，由 *S. marcescens* chitinase A 被解出的 3D 結構以及預測的反應機制之綜合分析結果，我們已鎖定活性內數個其他胺基酸，或有機會利用酵素工程技

術調整活性區內之 cavity 而改變產物的特異性，此部份仍將後續研究。

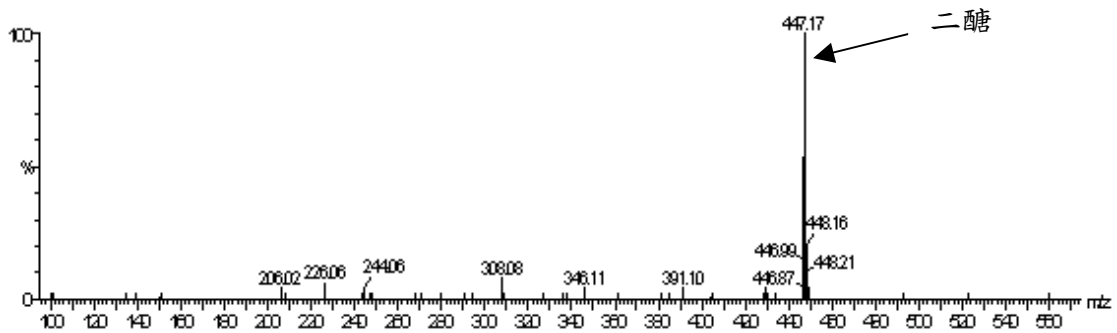
### 酵素法製備 10 克級 N-乙醯幾丁二醣

在以酵素法製備 N-乙醯幾丁二醣方面，我們選擇以  $\text{NH}_4\text{OAc}$  為緩衝液，主要因為是  $\text{NH}_4\text{OAc}$  為有機鹽類比較容易移除，而選擇的最佳之反應 pH 值為 5.0。

再利用我們所選殖的 *ChiA\_NCTU* 幾丁質酵素，來產生單一幾丁水解產物，將反應透過 phenol-chloroform 萃取的效果，達到分離蛋白質和 N-乙醯幾丁二醣的目的。依此方法可得到高純度的 N-乙醯幾丁二醣。



圖八、為蛋白質未除去之 MASS 圖(分子量 447)



圖九、為蛋白質已除去之 MASS 圖(分子量 447)

由此結果，我們可利用此 *exo-chitinase* 幾丁質水解酵素，生產較大量昂貴的 N-乙醯幾丁二醣。再由所合成出不同之受質來檢測酵素之動力學，藉以了解酵素的各種性質。

## 第四章 結論

針對 *Serratia marcescens* 幾丁質酵素 (*ChiA\_NCTU*) 之選殖、表現、純化及基因改造，其研究結果如下：

1. 經由定序，幾丁質酵素 (*ChiA\_NCTU*) 之基因共有 1692 個核 酸，轉譯後具有 563 個 胺基酸，分子量相當於 61033 Da。經與基因資料庫上 *Serratia marcescens ChiA* 具有 561

個胺基酸的 chitinase A 比較後，產生 26 個胺基酸上的差異；與具有 563 個胺基酸的 chitinase A 比對時發現，差異性均在 7 個胺基酸以內。顯然這些位置的變異並未影響酵素的活性。

2. *chi* gene 被建構於 pRSET A 載體上並轉型進入 *E. coli* JM 109 中，使之大量表現幾丁質酵素。此選殖菌株所生產之酵素為胞內酵素，經硫酸銨鹽沈澱、HIC 管柱；HiTrap SP 陽離子和 HiTrap Q 陰離子交換樹脂串聯管柱純化可得 90% 以上純度的 *ChiA\_NCTU*。
3. 經質譜儀偵測其分子量為 58605 Da，此數據證明 *ChiA\_NCTU* 為不含訊息胜 之成熟白質。可見 *ChiA\_NCTU* 在 *E. coli* 中表現時，*E. coli* 認得 *ChiA\_NCTU* 之訊息胜，並將酵素分泌至固定位置，但以何機制切除訊息胜 尚不得而知。故未來除訊息胜 的 DNA 序列，再將此未含訊息胜 的 DNA 序列進行蛋白質表現，以確認訊息胜 在 *E. coli* 中真的可被認得。
4. 本研究也對幾丁質酵素基因進行改造，希望藉由基因改造在酵素中形成雙硫鍵，以期增加酵素的熱穩定性，並研究酵素水解的最終產物。不過，目前之研究結果顯示，基因改造成功後突變株酵素之最佳反應溫度和水解產物並沒有發生改變，故是否有雙硫鍵之形成，須進一步的證實之。
5. 對於眾說紛紜的 chitinase 為何種水解形式，是 endo-chitinase 還是 exo-chitinase？我們由 *ChiA\_NCTU* 與幾丁寡醣反應結果發現，在特定條件下，可得單一產物“幾丁二醣”，證實 *ChiA\_NCTU* 為一 exo-chitinase。未來更期望能以 random 突變的方式，對某些基團進行突變，使酵素產生更具經濟價值的水解產物，例如：幾丁三醣、幾丁四醣等。
6. 利用此轉殖系統可大量表現並得一高純度 *ChiA\_NCTU*，其具有可生產單一幾丁寡醣的特性，可用來生產昂貴的 N-乙醯幾丁二醣。主要過程為：酵素先與 1% 的膠狀 chitin 反應，反應完後，經過酒精沉澱、萃取等步驟將鹽類及蛋白質除去，即可獲得純度 90% 以上之 N-乙醯幾丁二醣。目前本實驗室已成功生產 10 克以上之 N-乙醯幾丁二醣，接著可進行更大量的生產，乃至於 50 克或 100 克。